

**VALORACION DEL CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL INSECTICIDA ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFOS (LORSBAN®)**

**Informe final de pasantía de investigación**

**Por:**

**Alfredo Miguel Navas Ramírez**

**Directora:**

**Alma Polo Barrios**

**Msc. Biología Molecular**

**Msc. Biología Celular y Genética Molecular**

**Facultad de Ciencias Básicas**

**Programa de Biología**

**Universidad del Magdalena**

**2017**

## Introducción

Las microalgas se definen como organismos unicelulares fotosintéticos, distribuidos en subgrupos denominados algas verdes (Chlorophyta), algas rojas (Rhodophyta), diatomeas (Bacillariophyta) y algas verde-azul (Cyanophyta). El tamaño de las células oscila entre 0.5-200  $\mu\text{m}$  y poseen la capacidad de utilizar la materia orgánica como fuente de energía o de carbono (Ruiz, 2011). Se encuentran en diferentes hábitats acuáticos: dulces, marinos, salobres, residuales y además pueden vivir en el suelo. Estos organismos pueden tolerar variaciones en el pH y la temperatura (Córdoba et al., 2012).

La utilización de microalgas es muy variada. Se están utilizando en la industria alimentaria, acuicultura, producción de compuestos con potencial farmacéutico, y en biotecnología para la biorremediación de ecosistemas. Sin embargo, existe una diferencia en cuanto al uso de microalgas para fines comerciales, ya que para este fin se suelen aprovechar las características de cultivos celulares conocidos y ampliamente estudiados, mientras que en el caso de la biorremediación es más conveniente el aislamiento de poblaciones naturales locales propias del medio que se va a intervenir, con el fin de lograr una mejor adaptación de las cepas a las características de las regiones en las que se van a implementar (Santos et al., 2014).

La biorremediación es definida por Garbisu et al. (2002) como el proceso en el que se utilizan organismos vivos con la finalidad de degradar y/o transformar los contaminantes que se puedan encontrar en los ecosistemas terrestres y acuáticos a menos tóxicos (biocatalizadores). Para este fin se hace uso de bacterias, hongos, algas (fitorremediación) y plantas (fitorremediación) (Paisio et al., 2012).

Los clorpirifos, O-(3,5,6-tricloropiridin-2-il)-fosforotioato de O,O-dietilo (Geisy et al., 1999), se han venido utilizando como insecticida en las distintas actividades agropecuarias a nivel mundial, a pesar del alto grado de toxicidad que presenta (Murcia y Stashenko, 2008; Weselak et al., 2007; Hurtado y Gutiérrez, 2005). El alto grado de toxicidad y el perjuicio para las diferentes especies de los ecosistemas en los cuales es utilizado ha generado la búsqueda y aplicación de alternativas eficientes y sostenibles que permitan la biodegradación de este compuesto. Existen estadísticas a nivel mundial que reseñan el empleo de estos organofosforados en el cuidado de los cultivos agrícolas. En estas estadísticas, Colombia ocupa el cuarto puesto en América Latina en cuanto a la cantidad de pesticidas empleados por área sembrada (14.5 ton/1000 ha) según el informe N°7 de la Superintendencia de Industria y Comercio (2013). El primer puesto lo ocupan los clorpirifos, disponible comercialmente como Lorsban® (tabla 1). Según el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), el Lorsban® fue el agroquímico más vendido de la familia de los POF (organofosforados) durante el año 1999 (~243000 L/ 324 ton) (Henao et al., 2005; Morales y Rodríguez, 2004). Con base en el “Estudio de Residuos de Plaguicidas Agrícolas en Aguas Costeras del Caribe” realizado por la Unidad de Coordinación Regional para el Caribe-REPCar y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente en el 2012, en Colombia las zonas comprendidas entre el golfo de Urabá y la Ciénaga Grande de Santa Marta presenta una utilización de clorpirifos de 10 al 36% y en proporciones cuantificables de aproximadamente

35-100ng/L, que corresponden a valores superiores a los establecidos por la NOAA que son de máximo 11 ng/L.

**Tabla 1.** Pesticidas organofosforados de mayor uso en Colombia (Fernández et al., 2010)

<b>Categoría Toxicológica</b>	<b>Principio Activo</b>	<b>Nombre Comercial</b>
<b>I</b>	Diclorvos	Diclorvos, Vapona
	Mevinfos	Mevinfos
	Monocrotofos	Monocrotofos 600 SL
	Metilparation	Metilparation, Folido
	Paration	Parawet, Folidol
	Metamidofos	Tamarón, Monitor
<b>II</b>	Coumafos	Asuntol, CoRal
	Diazinon	Basidon
	Fention	Lebaycid 500 SC
	Profenofos	Curacron, Tambo
<b>III</b>	Clorpirifos	Dursban 48 Le – Lorsban
	Malation	Malathion, Aucuaфин

Así mismo, Bonilla et al. (2000) en el Informe Nacional sobre el “Uso y manejo de plaguicidas en Colombia”, identifica y propone alternativas para reducir el escurrimiento de plaguicidas al mar Caribe reportando una concentración de clorpirifos de 15ng/L en aguas subterráneas destinadas para consumo humano en el departamento del Magdalena. Estos datos constituyen una alarma para el sector público y privado, ya que podría indicar que estos compuestos se están infiltrando en los diferentes cuerpos de agua, los cuales para ser utilizados deben ser tratados y estos procesos serían muy complicados y costosos. En este mismo reporte se presentan los resultados de los estudios realizados en sedimentos y cuerpos de agua por la entidad Cortolima, dentro del marco del proyecto “Análisis de Residuos de Plaguicidas en Fuentes de Agua”, y en ellos se muestra que el 33% de las muestras analizadas (en un total de 239 muestras) estaban contaminadas con clorpirifos.

Aproximadamente, el 90% de los pesticidas aplicados son arrastrados hacia los cuerpos de agua, ya sea por la acción del viento o por escorrentía afectando así la biota (Torres y Capote 2004); por lo tanto, es necesario conocer los datos ecotoxicológicos de las sustancias para estimar el impacto sobre los ecosistemas asociados. La información ecotoxicológica de clorpirifos fue tomada de Roberts y Marshall (1998) en el Hazardous Substances Data Bank, en la que se muestran las concentraciones letales de estos compuestos en diferentes especies, como es el caso de los humanos (LC50: 300 mg/Kg), ratones (LC50: 1500 mg/Kg), conejos (LC50: 2000 mg/Kg), peces (LC50: 2610 µg/L - 96h), *Daphnia* estadio < 24 h (LC50: 0.79 µg/L – 48 h), algas (LC50: > 0.4 mg/L), aves (LC50: 18.6-46.7 mg/kg -7 días) y avispas (LC50: 0.38 µg/individuo).

Además, tomando en consideración otros estudios realizados sobre exposición crónica a bajas concentraciones de POF en ratones y cabras, se muestra el efecto nocivo de estos compuestos sobre el desarrollo del animal, así como también en su funcionamiento neurológico durante las diferentes etapas de crecimiento (Aguirre-Buitrago et al., 2014). Cabe resaltar finalmente, que el clorpirifos también afecta la salud de las personas que están en contacto con él, puesto que además de interferir a nivel de la sinapsis neuronal también actúa como un disruptor endocrino, compitiendo con la funcionalidad hormonal, como sucede a nivel de la TSH (tiroides) y la triyodotiroxina-T3. (Morales et al., 2010).

Debido a la toxicidad exhibida por el clorpirifos, se hace necesario el uso de técnicas físicas, químicas y biológicas para su remoción. Los dos primeros tipos corresponden a métodos en los que se realizan extracciones con disolventes, lavado con surfactantes, oxidación (utilizando  $\text{ClO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ) y fotólisis, lo que origina efectos adversos en el ambiente por la generación de residuos peligrosos (Volke y Velasco, 2002). Una de las técnicas biológicas que se ha empezado a utilizar para la remoción de tóxicos de suelo y agua es la biorremediación. Esta metodología consiste en el uso de organismos (microorganismos y organismos superiores) para degradar contaminantes presentes en el ambiente con el fin de transformarlos en sustancias menos tóxicas o con estructuras más simples. Este tratamiento tiene como ventaja que puede ser aplicado in situ (Betancur, 2013). Con base en el reporte de Díaz (2011) las tecnologías biológicas son menos costosas y menos destructivas al ecosistema si se le compara con las tecnologías de tratamientos convencionales. El empleo de microalgas en los procesos de biorremediación ha tomado auge en los últimos años debido a que los organismos utilizados se adaptan a las condiciones del medio y son capaces de utilizar los compuestos tóxicos como sustrato para su propio metabolismo (González et al., 2012).

Las cepas utilizadas en este estudio pertenecen a los géneros *Scenedesmus* y *Chlorella*. *Scenedesmus* es cosmopolita, ya que se puede encontrar en casi todos los cuerpos de agua y tiene como característica principal el poseer una morfología muy diversa, pero en general presentan cenobios planos de 2, 4, 8 y 16 células que están alineadas alternativamente (Moresco y Bueno 2007). En cuanto al género *Chlorella*, se conoce que también presenta una distribución cosmopolita, y que morfológicamente está representada por algas unicelulares esféricas o elipsoides pertenecientes al grupo de las algas verdes (Wehr y Sheath, 2003).

Dada la capacidad de las microalgas para utilizar distintos compuestos como sustrato para realizar procesos metabólicos que enriquezcan sus fuentes de alimento, estos microorganismos han sido utilizados con éxito en el tratamiento para descontaminación de efluentes industriales y domésticos, entre otros. Un ejemplo del uso de la biorremediación en cuerpos de agua contaminadas es el de Sivasubramanian et al. (2010), quienes emplearon *Desmococcus oivaceus* en el tratamiento de lodo de cromo proveniente de la industria de electroplateados, mediante la construcción de estanques abiertos.

## **Objetivo general**

Proporcionar las condiciones necesarias para el desarrollo de las habilidades y aptitudes investigativas del estudiante enfocadas al campo de la biorremediación de cuerpos de agua mediante la utilización de las microalgas.

## **Objetivos específicos**

- Organizar y mantener el cepario de microalgas del laboratorio de biotecnología de la Universidad del Norte
- Aislar y obtener cultivos puros de los géneros *Scenedesmus* y *Chlorella* a partir de muestras de cuerpos de agua del departamento del Atlántico.
- Exponer los cultivos puros de las microalgas de los géneros *Scenedesmus* y *Chlorella* a diferentes concentraciones de los clorpirifos (Lorsban®).

## **Justificación**

Las actividades realizadas en la Universidad del Norte relacionadas con los procesos exposición con microalgas resultan una buena oportunidad para el desarrollo de actividades encaminadas a procesos investigativos, algo que en un futuro ayudará a reducir los contaminantes presentes en cuerpos de agua que afectan estos sistemas biológicos. Debido a lo anterior se hace importante esta práctica investigativa ya que a futuro brindará las herramientas necesarias para contribuir al mejoramiento de la biodiversidad mediante la eliminación de contaminantes tóxicos.

## **Generalidades de la entidad**

La información que se presenta a continuación fue tomada de la página oficial de Universidad del Norte.

La Fundación Universidad del Norte inició su proceso de gestación y fundación definitiva entre 1959 y 1966, la Universidad inició sus labores académicas con 58 estudiantes y 10 profesores para los ciclos básicos de Administración de Empresas e Ingeniería.

En 1970 se logró la aprobación del programa de Psicología, en 1973 se inaugura oficialmente la ciudadela universitaria, en 1980 se creó la División de Ciencias de la Salud con la apertura de los programas de Medicina y de Enfermería; el programa de Educación Preescolar; el Centro de Investigaciones de la Universidad del Norte, CIUN. Además, inicia el programa de Ingeniería Civil. Así mismo hubo gran crecimiento de la planta física. En 1980 toma la rectoría Jesús Ferro Bayona.

Para la Universidad del Norte, 1994 se constituye en un año crucial, ya que el ICFES y Colciencias la aprueban como nodo regional en Barranquilla de la red CETCOL (Ciencia, Educación y Tecnología de Colombia) para tener acceso a la red mundial Internet. Adicionalmente, se firma un convenio de cooperación académica y científica con la Universidad de Mainz, Alemania. También, un convenio con la Universidad París XII Val-de-Marne, con el fin de fortalecer la maestría en Desarrollo Social y obtener

simultáneamente el título estatal francés en educación y lograr su acreditación a nivel internacional.

El 21 de agosto de 1997 se llevó a cabo la inauguración oficial de la nueva sede del Instituto de Idiomas de Uninorte. El 23 de octubre de 1997 se llevó a cabo la inauguración de la primera etapa del Hospital Universidad del Norte.

El Consejo Nacional de Acreditación, CNA, acreditó en 1999 el programa de Ingeniería Industrial, convirtiéndose éste en el primer programa de pregrado en ser acreditado en la Costa, y el segundo en esta área a escala nacional. En el año 2000 obtuvo la acreditación de los programas de Ingeniería Mecánica, Medicina y Psicología.

En el 2001 se inauguró el nuevo Coliseo Cultural y Deportivo, uno de los mejores del país. El 20 de noviembre de 2003 la Universidad recibió la Acreditación Institucional por parte del Ministerio de Educación.

## **Misión**

La Fundación Universidad del Norte, acorde con los principios, valores y objetivos que la guían desde su creación, tiene como misión la formación integral de la persona en el plano de la educación superior, y la contribución, mediante su presencia institucional en la comunidad, al desarrollo armónico de la sociedad y del país, especialmente de la Región Caribe colombiana.

## **Visión**

En el año 2022, la Universidad del Norte seguirá siendo una de las mejores universidades del país, de América Latina y el Caribe, por su compromiso con la excelencia en la formación de sus estudiantes y en la creación del conocimiento, su alto impacto en el desarrollo, regional y nacional, y el diálogo con la sociedad global en la búsqueda continua de un futuro mejor.

En la realización de visión a 2022, la universidad fortalecerá sus acreditaciones, su posicionamiento en los rankings internacionales como reconocimiento a la excelencia en los procesos de enseñanza-aprendizaje con innovación y pedagogía, el alto nivel científico de su cuerpo profesoral y la proyección internacional de la extensión.

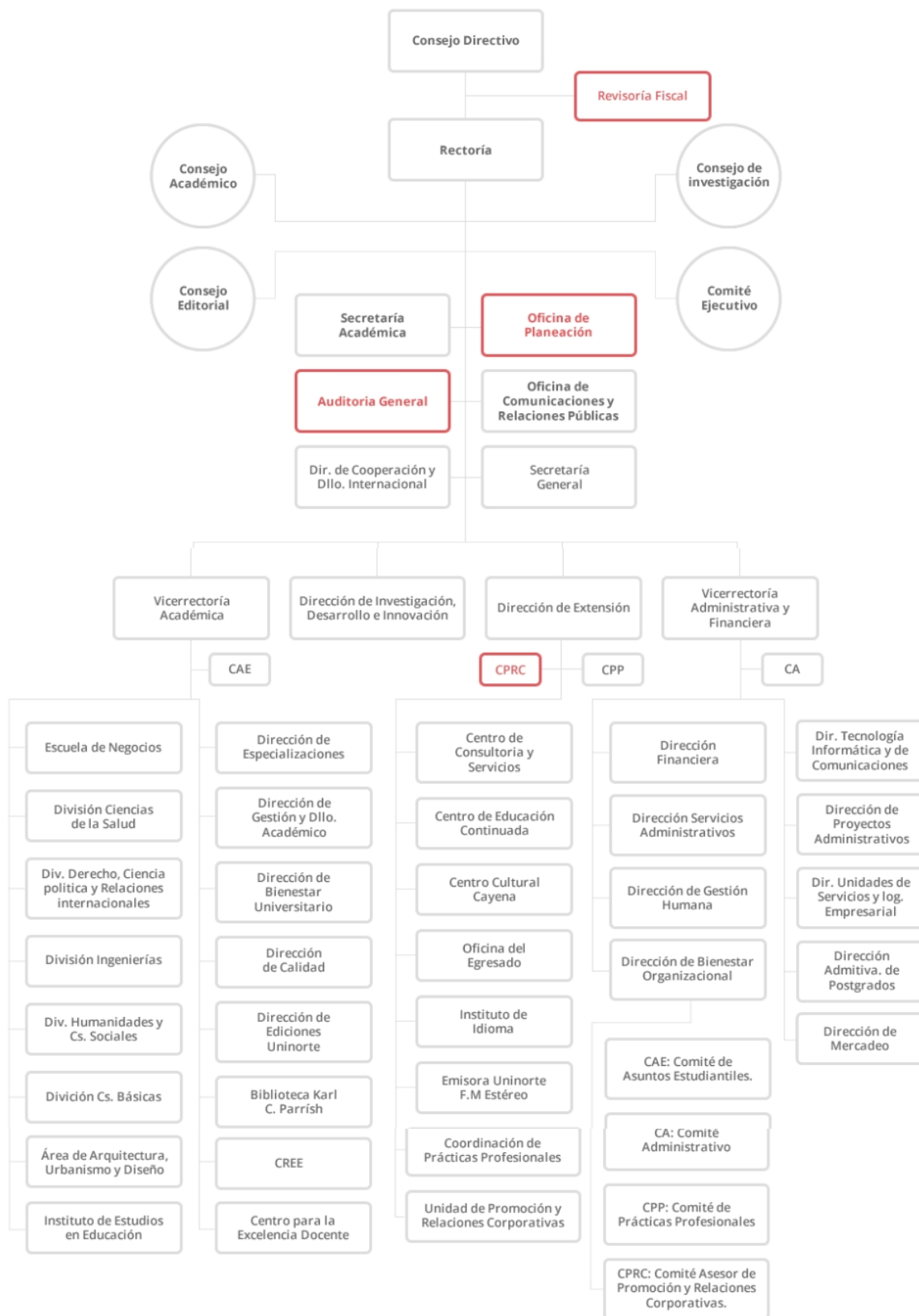
Incrementará y dinamizará la competitividad de sus egresados, quienes serán aliados estratégicos en la ejecución de proyectos y en el fortalecimiento de los vínculos con el sector empresarial.

## **Valores Institucionales**

- Compromiso con la excelencia
- Formación para el liderazgo y la gestión empresarial, social y pública
- Ética e integridad institucional
- Sentido de pertenencia

- Aprecio por la verdad
- Sentido de la justicia
- Compromiso social
- Respeto por la diversidad
- El ejercicio de la autonomía universitaria

## Organigrama de la Fundación Universidad del Norte





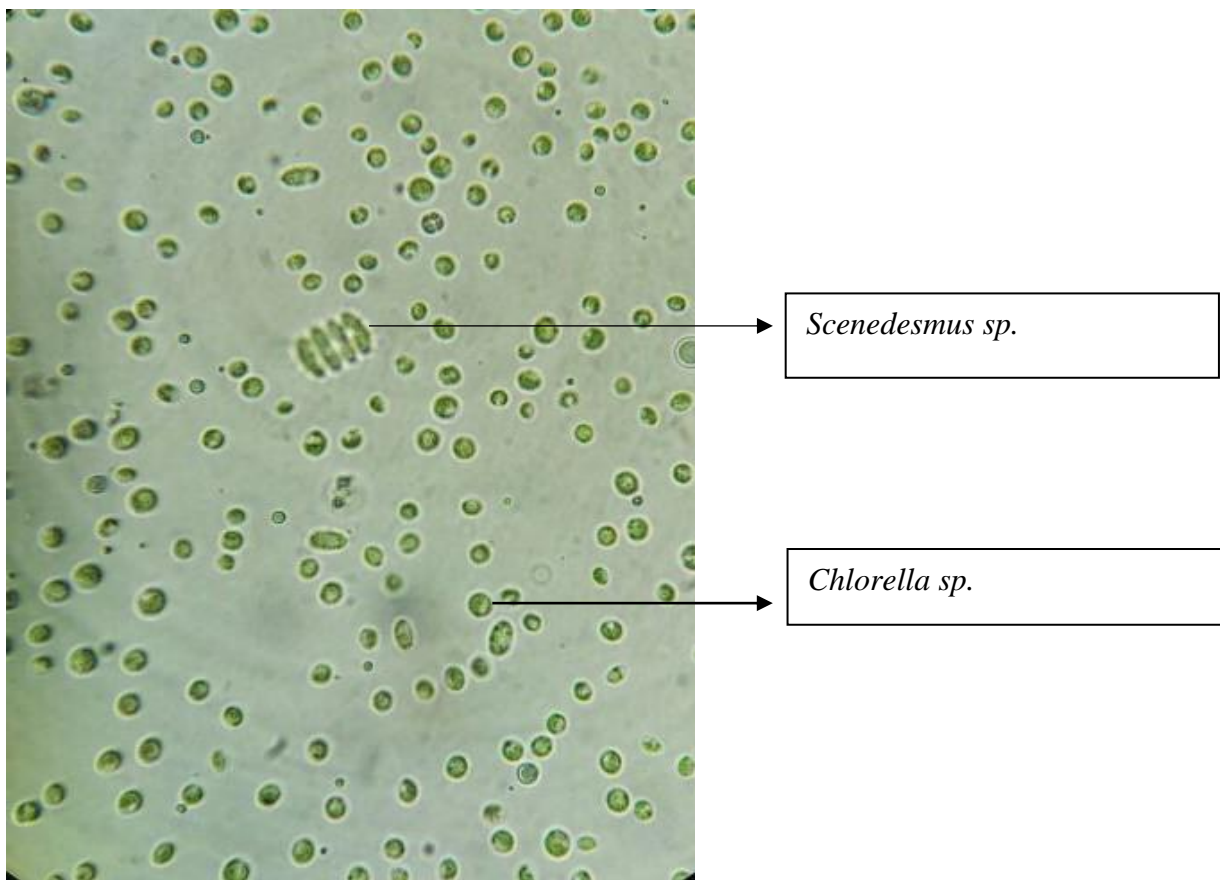
## Resultados

### Mantenimiento de cepario de microalgas del laboratorio de biotecnología

Para el mantenimiento de las cepas, estas fueron alimentadas cada tres días con BBM (Medium Bold Basal) y se oxigenaron a diario durante 15 minutos en agitador mecánico.

### Aislamiento de cepas de *Chlorella* y *Scenedesmus*

Para el aislamiento de las especies *Chlorella* y *Scenedesmus* en el laboratorio se utilizó el método de las diluciones seriadas.

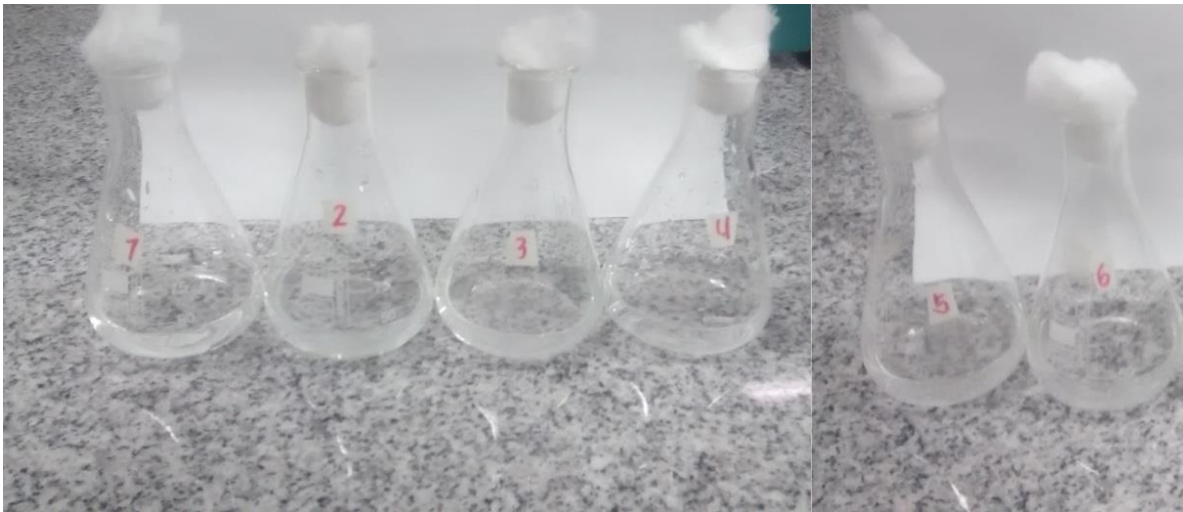


**Figura 1.** Especies aisladas mediante dilución seriada.

### Exposición de cepas de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* al insecticida clorpirifos

Los cultivos se prepararon en Erlenmeyer de 100ml los cuales contenían 30 ml de medio de cultivo BBM a los cuales se les adicionó una alícuota de 50µL de cultivo de microalgas previamente aisladas.

Se prepararon 6 cultivos a distintas concentraciones del insecticida clorpirifos conocido comercialmente como Lorsban®. Para este ensayo, a los diferentes cultivos se le agregó el pesticida en concentraciones de 0µg/L, 50µg/L, 100µg/L, 200µg/L, 300µg/L y 400µg/L.



**Figura 2.** Cultivos de microalgas durante el primer día de crecimiento sin la adición del pesticida.

Los cultivos se dejaron crecer durante una semana sin la adición del pesticida. Una semana después de haber sembrado los cultivos a cada uno se le adicionó el pesticida en las concentraciones previamente mencionadas.



**Figura 3.** Cultivos de microalgas durante el día 7 con adición de las diferentes concentraciones del pesticida.

Los Erlenmeyer se codificaron de la siguiente manera: 1 (50  $\mu\text{g/L}$ ), 2 (100  $\mu\text{g/L}$ ), 3 (200  $\mu\text{g/L}$ ), 4 (300  $\mu\text{g/L}$ ), 5 (400  $\mu\text{g/L}$ ) y 6 (0 $\mu\text{g/L}$ ). El crecimiento de las cepas se midió por espectrofotometría a 379nm durante 17 días. Las mediciones se realizaron los días Lunes-Viernes; en los días sábados y domingos no se realizaron las mediciones correspondientes.



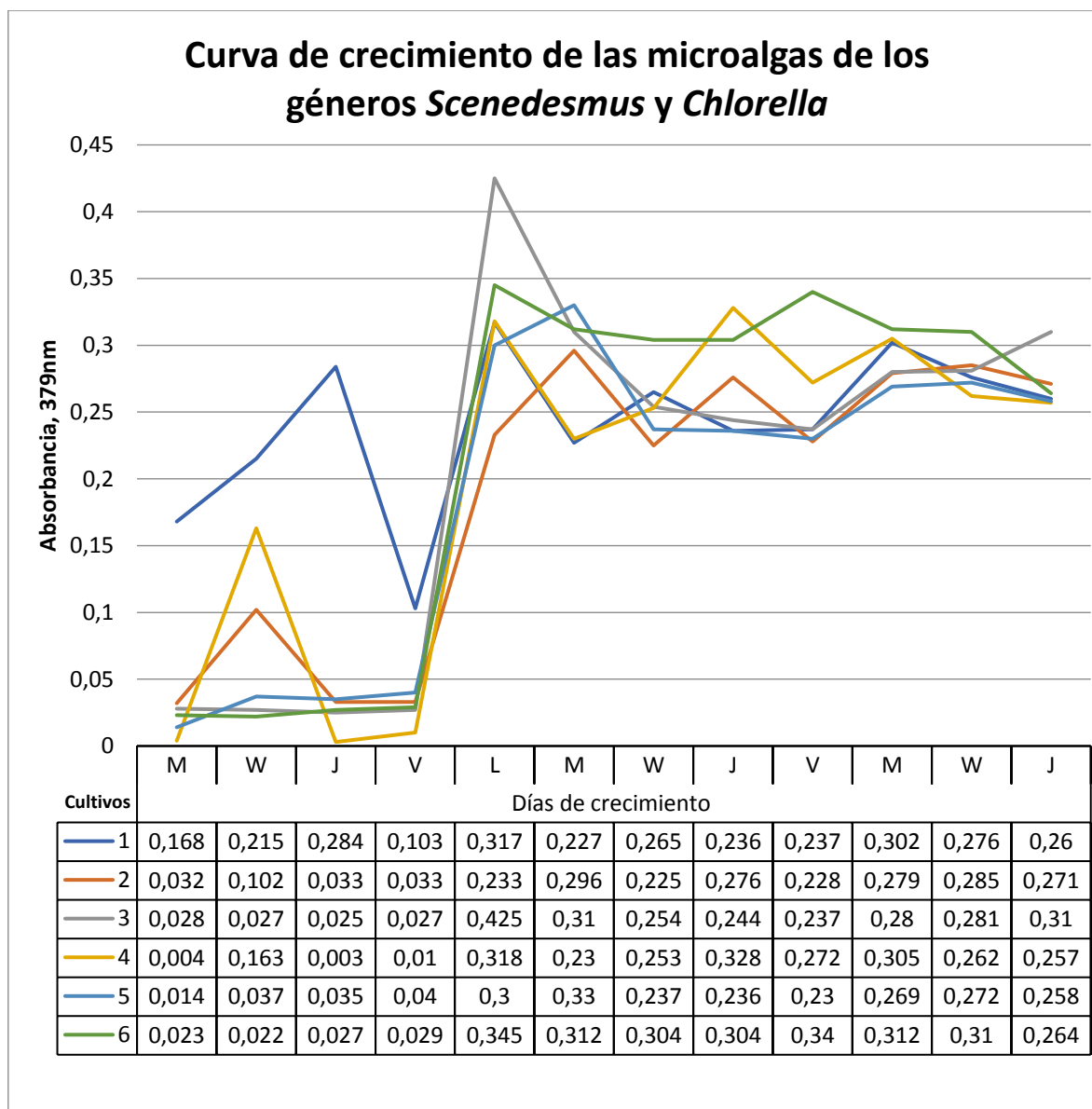
**Figura 4.** Cultivos de microalgas durante el día 15 de crecimiento con adición de las diferentes concentraciones del pesticida.

En la figura 4 se observa que los cultivos 1-4, a los 15 días, presentaban un color verde intenso mientras que el cultivo número 5, el de mayor concentración del pesticida aún se encontraba incoloro.



**Figura 5.** Cultivos de microalgas durante el día 17 de crecimiento con adición de las diferentes concentraciones del pesticida.

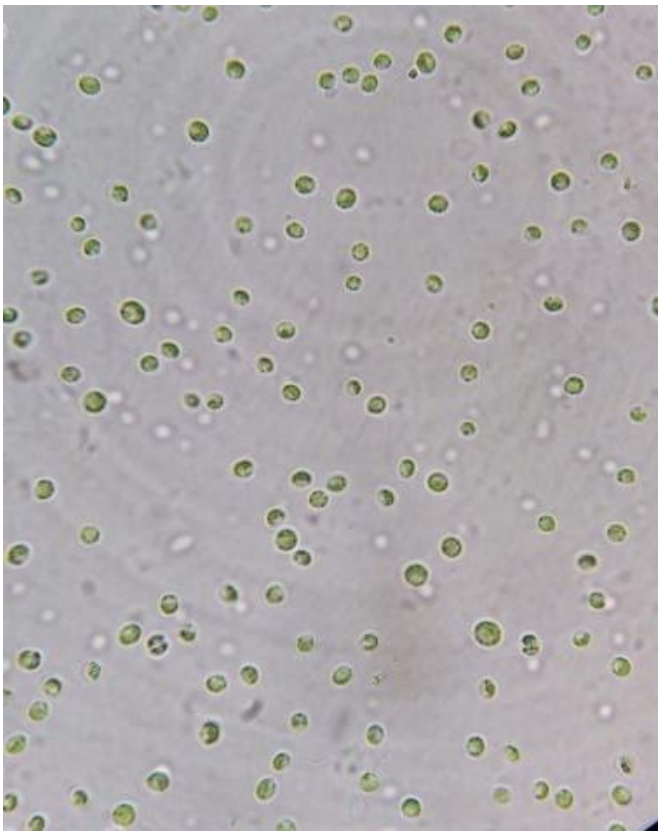
En el día 17, se observó el aumento de la tonalidad verde en el cultivo número 5, en el cual se había agregado la concentración más alta del pesticida.



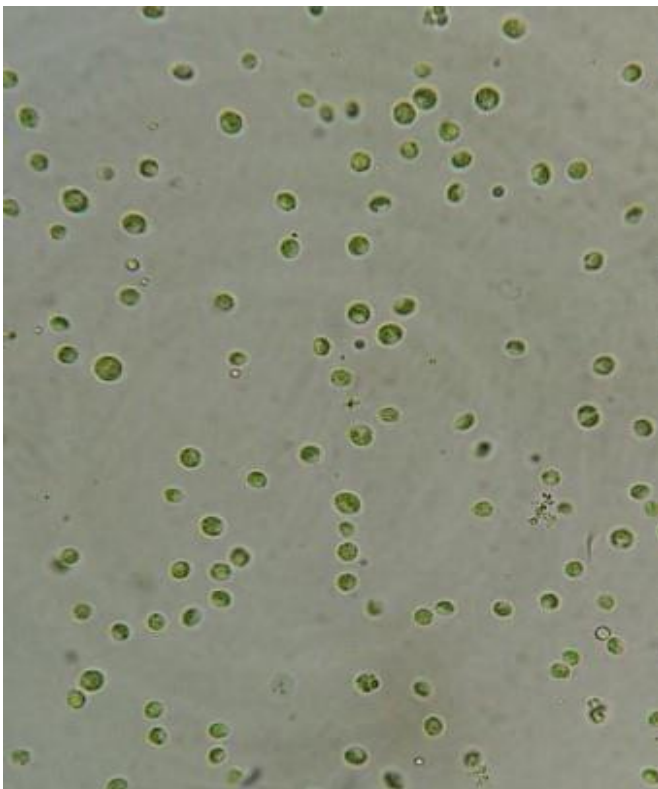
**Figura 6.** Curva de crecimiento para medición de densidad celular. A partir del día 7 los cultivos fueron expuestos a las distintas concentraciones del pesticida.

Para establecer la curva de crecimiento de los cultivos antes y después de la exposición al pesticida, todos los días se hicieron mediciones de las absorbancias de los mismos a una longitud de onda de 379nm, después de haber realizado un barrido de longitud de onda para conocer el máximo de absorción de luz del cultivo.

Luego de 6 días de exposición al pesticida se hicieron observaciones de los cultivos al microscopio.

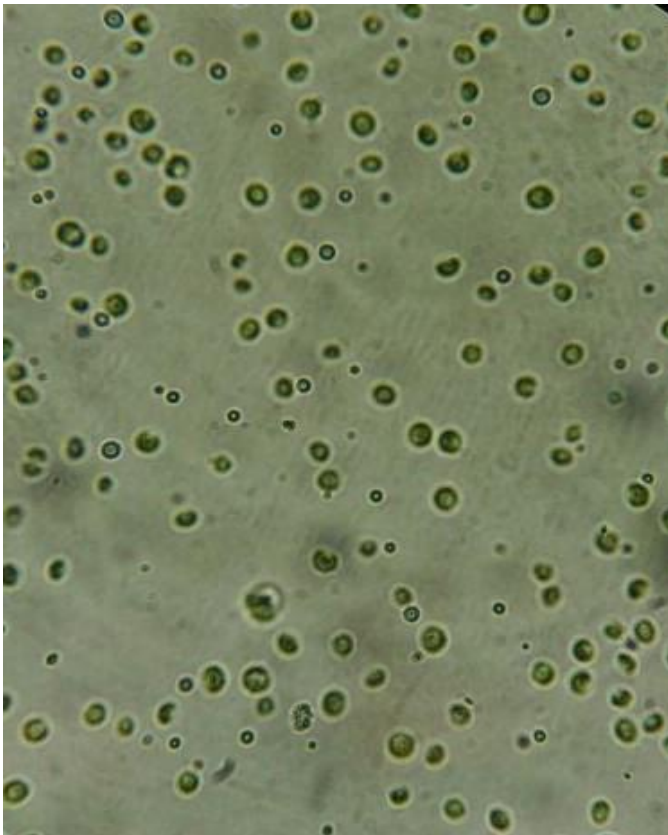


**Figura 7.** Cultivo 1, objetivo 100x.

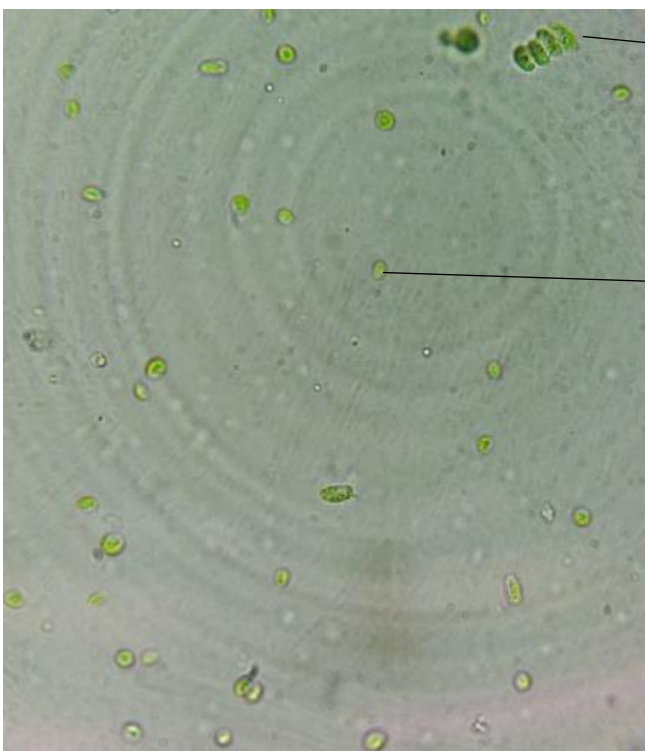


**Figura 8.** Cultivo 2. Objetivo 100x.





**Figura 9.** Cultivo 3, objetivo 100x.



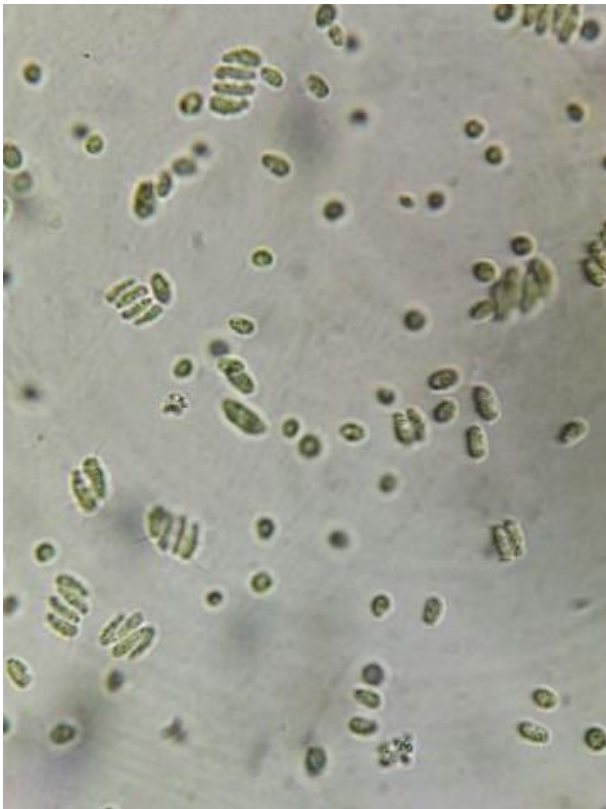
*Scenedesmus*

*Chlorella*

**Figura 10.** Cultivo 4, objetivo 100x



**Figura 11.** Cultivo 5, objetivo 100x.



**Figura 12.** Cultivo 6, objetivo 100x.

En las figuras 7, 8, 9 y 11 que corresponden en su orden a los cultivos con concentraciones de 50 µg/L, 100 µg/L, 200 µg/L y 400 µg/L sólo se puede observar la presencia de *Chorella*. Mientras que en la figura 10 que corresponde al cultivo con una concentración de 300 µg/L de pesticida se puede observar a diferencia de los demás cultivos la presencia en este de ambos géneros *Chorella* y *Scenedesmus*.

En la figura 10, se observó la presencia de cepas del género *Scenedesmus*, lo que contradice lo planteado anteriormente – *Scenedesmus* es sensible al clorpirifos. Esta fotografía fue tomada luego de realizarse un ensayo en el que se sugería que el género *Chlorella* era capaz de degradar el clorpirifos y utilizarlo como fuente de nutrientes. Para ensayar lo expuesto, se le adicionó una alícuota de 1ml del cultivo que había crecido con 0µg/L de clorpirifos al cultivo 4 que contenía una concentración de 300 µg/L de Lorsban®. Después de 3 días de incubación de este cultivo se evidencia el crecimiento de microalgas del género *Scenedesmus*.

**Tabla 2.** Mediciones del pH de los cultivos en tres distintos días de exposición. Los números 1, 2 y 3 en cuanto a la medición de pH corresponden a los días 15, 16 y 17 de inicio del cultivo. La denominación BBM se refiere al medio de cultivo sin la presencia de microalgas y pesticida.

Cultivo	Valores de pH		
	Días de medición		
	1	2	3
1	6-7	6-7	6-7
2	6-7	6-7	6-7
3	6-7	6-7	6-7
4	6-7	6-7	6-7
5	5-6	5-6	6-7
6	6-7	6-7	6-7
BBM	5-6	5-6	5-6

Como se referencia en la tabla 2, el pH del medio de cultivo BBM oscila entre 5 y 6. Las mediciones en los días 10 y 11, se realizaron teniendo en cuenta que todos los cultivos a excepción del cultivo número 5 presentaban un alto crecimiento de microalgas, que se evidenciaba por el cambio de coloración del medio que pasó de incoloro a una tonalidad verde intensa. Las mediciones de pH en estos cultivos oscilaban entre 6 y 7. En el caso del cultivo 5 el pH llega a unos valores de 6-7 sólo cuando el crecimiento de la microalga era evidente debido a la aparición de una tonalidad verde intensa en el cultivo. Esto puede sugerir que a medida que la concentración celular aumenta el pH tiende a neutralizarse.



## Conclusiones

El cumplimiento de cada uno de los objetivos planteados en la pasantía contribuyó en gran medida al mantenimiento en óptimas condiciones del cepario de microalgas que redundó en beneficios para los grupos de investigación que las utilizan en los diferentes trabajos de investigación. Es necesario recalcar que se obtuvo todo el material que se necesitó para elaborar la propuesta de trabajo y esto contribuyó al mejoramiento de habilidades relacionadas con el trabajo de microalgas.

En cuanto a los resultados del trabajo de investigación, se observó que los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* son los más comunes en los cuerpos de agua muestreados. Los resultados mostrados en las figuras 7, 8, 9 y 11, en las que se observa la prevalencia del género *Chlorella*, permite inferir la resistencia de este género al contaminante clorpirifos mientras que la cepa del género *Scenedesmus* muestra una alta sensibilidad al insecticida. En general esta última Microalga mostró una baja tolerancia a las concentraciones del pesticida ensayadas en el experimento.

## Bibliografía

Aguirre-Buitrago, J., Narváez-González, S., Bernal-Vera, M., Y Castaño-Ramírez, E. 2014. Contaminación de operarios con clorpirifos, por práctica de “embolsado” de banano (*Musa sp.*) en Urabá, Antioquia. Revista Luna Azul, 38, 191-217.

Andersen, R., Berges, J., Harrison, P., Watanabe, M. 2005. Recipes for Freshwater and Seawater Media, Algal Culturing Techniques. Elsevier.

Betancur, B. 2013. Biorremediación de suelo contaminado con el pesticida 1, 1, 1-tricloro-2, 2'bis (p-clorofenil) etano (DDT) mediante protocolos de bioestimulación y adición de surfactante (tesis doctoral) Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

Bonilla, J. P., Peinado, J. E., Urdaneta, M. A., Y Carrascal, E. 2000. Informe Nacional sobre el uso y manejo de plaguicidas en Colombia, tendiente a identificar y proponer alternativas para reducir el escurrimiento de plaguicidas al Mar Caribe. Bogotá: Ministerio del Medio Ambiente. Colombia.

Córdoba, M., González, G., Y Caberio, K. 2012. Relación entre parámetros de proceso fotótrofo y la producción de lípidos de interés industrial en microalgas de la división Chlorophyta.

Díaz, J. 2011. Revisión: Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín, 64(1), 5867-5882.

Estudio Sobre Plaguicidas en Colombia N° 7, Súper Intendencia de Industria y Comercio 2013.

Fernández, D; Mancipe, L Y Fernández, D. 2010. Intoxicación por organofosforados. Revista Med, 18(1), 84-92.

Garbisu, C., Amézaga, I., Y Alkorta, I. 2002. Biorremediación y ecología. Revista Ecosistemas, 11(3).

Geisy, J., Solomon, K., Coats, J., Dixon, K., Gidding, J Y Kenaga, E. 1999. Chlorpyrifos: Ecological Risk Assessment in North American Aquatic Environments. Environ Contam Toxicol 160, 1-129.

González, R., García-Balboa, C., Rouco, M., Lopez-Rodas, V., Y Costas, E. 2012. Adaptation of microalgae to lindane: A new approach for bioremediation. Aquatic Toxicology, 109, 25-32.

Henao, B., Palacio, J. A., Y Camargo, M. 2005. Evaluación genotóxica de los plaguicidas Cipermetrina y Diazinón en Tilapia Roja (*Oreochromis sp.*). Actualidades Biológicas, 27(82), 43-55.

Hurtado, C., Y Gutiérrez, M. 2005. Enfoque del paciente con intoxicación aguda por plaguicidas Organofosforados. Revista de la Facultad de Medicina, 53(4), 244-258.

Moresco, C., Y Bueno, N. 2007. Scenedesmaceae (Chlorophyceae–Chlorococcales) de un lago artificial urbano: *Desmodesmus* e *Scenedesmus*-DOI: 10.4025/actascibiolsoci. v29i3. 483. Acta Scientiarum. Biological Sciences, 29(3), 289-296.

Morales, C., Y Rodríguez, N. 2004. El clorpirifos: Posible disruptor endocrino en bovinos de leche. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 17(3), 255-266.

Morales, C., Rodríguez, N., Restrepo, L., Y López, Carlos. 2010. Relación entre residuos de clorpirifos en leche y sangre de vacas Holstein y niveles séricos de estradiol y tiroxina. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 11(1), 1-22.

Murcia, A. M., Y Stashenko, E. 2008. Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia. Agro sur, 36(2), 71-81.

Paisio, C. E., González, P. S., Talano, M. A., Y Agostini, E. 2012. Remediación biológica de Mercurio: Recientes avances. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, 3(2), 119.

REPCar. 2012. Residuos de plaguicidas agrícolas en aguas costeras del Caribe Colombia, Costa Rica y Nicaragua. Visto en [<http://cep.unep.org/repacar/acerca-del-proyecto/publicaciones-finales/REPCar%20Coastal%20Monitoring-es.pdf>] el 20/10/2016 a las 14:00.

Roberts, J., Y Marshall, W. 1998. Ecotoxicology of Chlorpyrifos. Editorial Canada Nrc Publication. 256 pp.

Ruiz, A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente.

Santos, A., González-Arechavala, Y., Y Martín-Sastre, C. 2014. Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas.

Sivasubramanian, V., Subramanian, V., Y Muthukumaran, M. 2010. Bioremediation of chrome-sludge from an electroplating industry using the micro alga *Desmococcus olivaceus*- A pilot study. Algal Biomass, 1 (3): 104-128.

Torres, D., Y Capote, T. 2004. Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. Revista Ecosistemas, 13(3).

Universidad del Norte. 2017. Visto en: [www.uninorte.edu.co]. Visto el 29/05/2017 a las 18:30.

Volke T., Y Velasco J. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología.

Wehr J, Sheath R. 2003, Freshwater algae of North America: Ecology and classification, Aquatic Ecology Series, Academic Press, San Diego.

Weselak, M., Arbuckle, T., Y Foster, W. 2007. Pesticide exposures and developmental outcomes: the epidemiological evidence. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 10(1-2), 41-80.

---

**FIRMA DEL ESTUDIANTE**

---

**Vo Bo DEL TUTOR**

## ANEXO

### **BOLD'S BASAL MEDIUM (BBM);** Andersen et al. (2005).

Este medio ha sido empleado exitosamente en el cultivo de microalgas en el laboratorio de biotecnología de la Universidad del Norte, Barranquilla; en los años 2010 a 2016.

Ingredientes:

#### Macronutrientes

Sustancia	Fórmula química	Masa de sustancia (g)	Volumen de soluto (ml)
Nitrato de sodio	NaNO <sub>3</sub>	10	400
Cloruro de calcio dihidratado	CaCL <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1	400
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	3	400
Difosfato de potasio trihidratado	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O	3	400
Fosfato biácido de potasio trihidratado	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O	7	400
Cloruro de sodio	NaCl	1	400

#### Micronutrientes

Sustancia	Fórmula química	Masa de sustancia (mg)	Volumen de soluto (ml)
EDTA e hidróxido de potasio	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	5900	100
	KOH	3100	
Sulfato ferroso	FeSO <sub>4</sub>	498	100
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1142	100
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub>	882	100
Cloruro de Manganeseo	MnCl <sub>2</sub>	166	100
Óxido de molibdeno	MoO <sub>3</sub>	11	100
Molibdato de Sodio*	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	14	100
Sulfato cúprico	CuSO <sub>4</sub>	151	100
Nitrato de Cobalto	CO(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	44	100

#### Preparación:

Para preparar un litro de nutriente deberán mezclarse 10ml de cada una de las soluciones con macronutrientes y 1ml de cada una de las soluciones con micronutrientes. A la mezcla se añade agua destilada (932ml) hasta completar un litro. El volumen resultante se lleva en un frasco Schott a la autoclave y se esteriliza a 110°C por espacio de una hora.